

ЭКСПРЕССИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ГЕНА *HRPN_{PC}* В РАСТЕНИЯХ КАРТОФЕЛЯ ИЗМЕНЯЕТ ЭКСПРЕССИОННЫЙ ФОН ГЕНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

О.К. Присяженко

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

e-mail: prisya@mail.ru

Введение

Было показано, что обработка растений препаратом бактериального белка «харпина» приводит к образованию устойчивости к широкому спектру патогенов, что выражается в повышении уровня экспрессии PR генов и снижении симптомов заболевания при заражении патогенами [1]. Харпин – это кислый термостабильный богатый глицином белок, способный вызывать реакцию гиперчувствительности, являющийся субстратом системы секреции белков третьего типа (Hrp – hypersensitive reaction and pathogenicity). Впервые такой белок был обнаружен у фитопатогенной бактерии *Erwinia amylovora* (HrpN_{Еа}) [2]. Этот патоген вызывает бактериальный ожог у яблонь, слив и других представителей семейства Розоцветные. У других фитопатогенов были выявлены гомологичные белки, вызывающие реакцию гиперчувствительности и, как было показано для некоторых, способные вызывать устойчивость к болезни (харпины) [3]. Также было показано, что введение в геном растения гена харпина из *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* приводит к повышенной конститутивной устойчивости трансгенов к различным патогенам [4].

Ранее в нашей лаборатории были созданы трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* cv. *Petit Havana SR1*, несущие в своем геноме ген харпина HrpN *Pectobacterium carotovorum*. Экспрессия этого гена в растениях табака оказала влияние на экспрессионный фон генов иммунной системы. Причем, система устойчивости к некротическим патогенам была в прямой зависимости от уровня экспрессии трансгена, в то время как система устойчивости к биотрофным, в обратной [5, 6]. В данной работе целью было определить, как экспрессия гена этого харпина повлияет на экспрессионный фон генов иммунной системы растений картофеля.

Методы исследований

1. Трансгенные растения картофеля сорта «Скарб», несущие ген *hrpNPc*, были получены методом агробактериальной трансформации листовых дисков. Бинарный вектор, несущий целевой ген был сконструирован на основе вектора pBI121.

2. Уровень экспрессии различных генов определяли методом количественной ПЦР с использованием интеркалирующего флюорофора SYBR Green (SIGMA) на основе кДНК исследуемых растений. В качестве референсных генов использовали ген α -субъединицы фактора элонгации транскрипции 1 (*EF1- α*) и ген *SAND*. Вычисления производились при помощи компьютерной программы «REST».

Результаты и обсуждение

Из 33х канамицин-устойчивых линий вставка в геном была подтверждена у семи. В них при помощи количественной ПЦР был измерен уровень экспрессии трансгена (рисунок 1).

Как видно из рисунка, линиями с самым высоким уровнем экспрессии трансгена оказались n14 и n18; самый низкий уровень экспрессии наблюдался в линии n22.

Далее в этих линиях были измерены уровни экспрессии некоторых PR генов (рисунок 2). За единицу был взят уровень экспрессии этих генов в нетрансгенном растении.

Как видно из диаграммы, экспрессия генов *PR1*, *PR1b*, *VS2*, *HIN1*, *HSR203J*, *GST1* и *RboHC* либо была достоверно ниже уровня в нетрансгенных растениях, либо не отличалась. Увеличение количества продуктов этих генов обеспечивает устойчивость к некротическим патогенам, что в нашем случае может говорить о предположительном снижении устойчивости к этой группе патогенов.

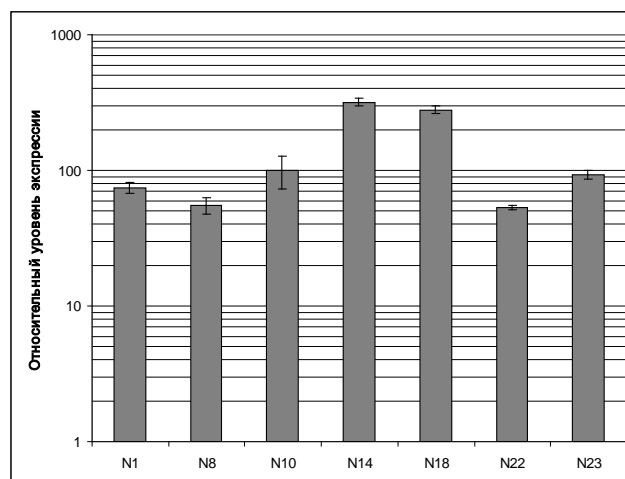


Рисунок 1 – Относительный уровень экспрессии трансгена в линиях картофеля

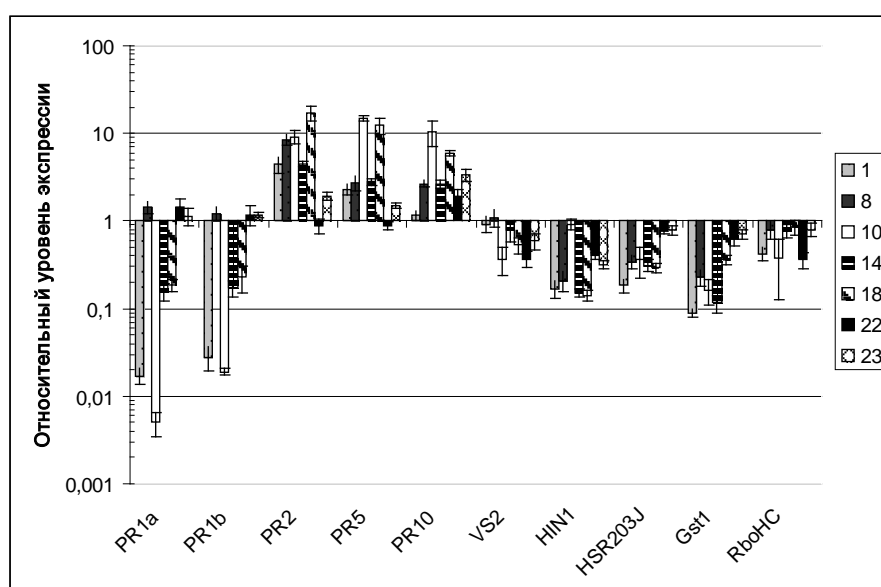


Рисунок 2 – Относительный уровень экспрессии PR генов в трансгенных линиях картофеля

Экспрессия генов *PR2*, *PR5* и *PR10* была выше, чем в нетрансгенных растениях. Увеличение уровня продуктов этой группы генов может говорить о повышении защиты против биотрофных патогенов.

Выводы

Исходя из полученных данных можно сделать вывод, что экспрессия гена *hrpNPc* в растениях картофеля сорта «Скарб» предположительно понижает устойчивость к некротрофным патогенам и увеличивает к биотрофным. Для подтверждения этого предположения предстоит провести патологические тесты.

Как вариант применения данного генетического изменения, можно предложить внесения гена *hrpNPc* под регуляцией индуцируемого промотора, во избежание конститутивно повышенной восприимчивости к некротрофным патогенам.

Список литературы

1. Harpin-elicited hypersensitive cell death and pathogen resistance require the NDR1 and EDS1 genes / J.-L. Peng [et al.] // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. – 2003. – Vol. 62, № 317. – P. 326.
2. Harpin, Elicitor of the Hypersensitive Response produced by the Plant Pathogen *Erwinia amylovora* / Z. Wei [et al.] // *Science*. – 1992. – Vol. 257.

3. Strobel, R.N. Induction of systemic acquired resistance in cucumber by *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* 61 hrpZ_{pss} protein / R.N. Strobel, J.S. Gopalan, J.A. Kuc, S.Y. He // *The Plant Journal* 1996. – Vol 9. – P. 431–439.

4. Expression of HarpinXoo in Transgenic Tobacco Induces Pathogen Defense in the Absence of Hypersensitive Cell Death / J. Peng [et al.] // *Phytopathology*. – 2004. – Vol. 94, № 10. – P. 1048–1055.

5. Присяжненко, О.К. Экспрессия гена харпина HrpN *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* в растениях табака индуцирует гены устойчивости / О.К. Присяжненко, Е.А. Николайчик, А.Н. Евтушенко // Доклады НАН Беларуси. – 2007. – Т. 51, №5. – С. 85–89.

6. Prisyazhnenko, O.K. Tobacco plants transgenic in *Erwinia carotovora* harpin HrpN gene are less sensitive to infection with *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* than untransgenic plants / O.K. Prisyazhnenko, A.N. Evtushenkov // Abstract book of the VI International Scientific Conference "Youth and Progress of Biology" Lviv, Ukraine, 21–24 September 2010, p. 195.